



TUGAS AKHIR - SB141510

POTENSI *Azotobacter* SEBAGAI PELARUT FOSFAT

**AMELIA ISLAMIATI
NRP 1511 100 027**

**Dosen Pembimbing :
Dr. Enny Zulaika, MP.
NIP. 19600109 198803 2 001**

**Jurusan Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Surabaya
2015**



FINAL PROJECT - SB141510

POTENCY OF *Azotobacter* AS PHOPHATE SOLUBILIZING BACTERIA

**AMELIA ISLAMIATI
NRP 1511 100 027**

**Advisor Lecturer :
Dr. Enny Zulaika, MP.
NIP. 19600109 198803 2 001**

**BIOLOGY DEPARTMENT
Mathematics and Natural Science Faculty
Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Surabaya 2015**

HALAMAN PENGESAHAN

POTENSI *Azotobacter* SEBAGAI PELARUT FOSFAT

TUGAS AKHIR

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat
Memperoleh Gelar Sarjana Sains
Pada
Jurusan S-1 Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh:

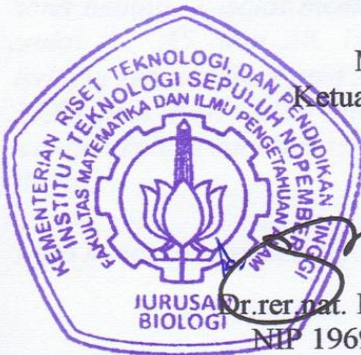
AMELIA ISLAMIATI
NRP. 1511 100 027

Disetujui oleh Pembimbing Tugas Akhir:

Dr. Enny Zulaika, MP (Pembimbing 1)

Surabaya, 8 Juli 2015

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi



Dr. rer. nat. Ir. Maya Shovitri, M.Si
NIP 19690907 199803 2 001

POTENSI *Azotobacter* SEBAGAI PELARUT FOSFAT

Nama Mahasiswa : Amelia Islamiati
NRP : 1511 100 027
Jurusan : Biologi
Dosen Pembimbing : Dr. Enny Zulaika, MP.

Abstrak

Fosfat merupakan salah satu unsur makro esensial. Secara alami fosfat di dalam tanah berbentuk senyawa organik dan anorganik yang tidak larut, sehingga ketersediaannya di tanah sangat terbatas. Aktivitas mikroba tanah berpengaruh terhadap ketersediaan fosfat di dalam tanah melalui sekresi asam organik dan enzim fosfatase yang dihasilkan oleh mikroba sehingga fosfat tidak larut menjadi fosfat terlarut. Azotobacter telah diisolasi dari lahan Eco Urban Farming ITS. Isolat Azotobacter tersebut mampu melakukan metabolisme karbohidrat dan menghasilkan asam organik.

Skrining isolat yang berpotensi melarutkan fosfat secara kualitatif menggunakan medium Pikovskaya padat ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni. Tiga isolat yang memiliki Indeks Kelarutan Fosfat (IKF) terbesar diuji kemampuannya dalam melarutkan fosfat menggunakan medium pikovskaya cair.

Hasil skrining menunjukkan 8 isolat mampu membentuk zona bening. 3 isolat memiliki nilai IKF yang relatif tinggi yaitu isolat A2, A5, dan A8. Isolat A2 mampu menghasilkan fosfat terlarut sebesar 31,9 ppm A5 sebesar 27,59 ppm, dan A8 sebesar 37,93 ppm. Ke-3 isolat menunjukkan hasil bahwa semakin lama waktu inkubasi konsentrasi fosfat terlarut yang dihasilkan semakin tinggi.

Kata kunci; Azotobacter, fosfat terlarut, IKF, pikovskaya

POTENCY OF *Azotobacter* AS PHOSPHATE SOLUBILIZING BACTERIA

Student Name : Amelia Islamiati
NRP : 1511 100 027
Department : Biologi
Advisor Lecturer : Dr. Enny Zulaika, MP.

Abstract

Phosphate is an essential macro elements. Phosphate in the soil form of organic and inorganic compounds are not soluble, so that availability in the soil is very limited. Soil microbial activity affects the availability of phosphate in the soil through organic acid secretion and phosphatase enzyme produced by microbes so that insoluble phosphate becomes soluble phosphate. *Azotobacter* has been isolated from the soil in Eco Urban Farming ITS. *Azotobacter* isolates are able to metabolize carbohydrates and produce organic acids.

Qualitative screening isolates using Pikovskaya solid medium, the formation of a clear zone around the colonies showed positive results in which isolates were able to dissolve the phosphate. Three isolates which have the largest phosphate solubility index (IKF) were tested for their ability to dissolve phosphate using Pikovskaya liquid medium.

Screening results proved that 8 isolates were able to set up a clear zone. Three isolates have the value of high IKF; isolates A2, A5, and A8. A2 isolates were able to produce soluble phosphate 31.9 ppm, A5 27.59 ppm and A8 37.93 ppm. All three isolates indicated that the longer the incubation time, the higher the concentration of dissolved phosphate generated.

Keyword; *Azotobacter*, ikf, phosphate, pikovskaya

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, rasa syukur tiada tara dipanjatkan kehadiran Allah SWT yang telah memberikan karuniaNya dan kasih sayangNya yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul **Potensi *Azotobacter* Sebagai Pelarut Fosfat**. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari 2015 – April 2015. Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya karena dalam menyelesaikan tugas akhir ini tidak lepas dari bimbingan dan bantuan berbagai pihak. Ayah dan Ibu tercinta yang senantiasa mendoakan ananda dalam setiap doanya. Terima kasih kepada Ibu Dr. Enny Zulaika, MP sebagai dosen pembimbing yang telah banyak memberikan bimbingan, masukan, dan dukungan melalui pendanaan PNBPN ITS sesuai dengan nomer kontrak 003246.256/IT2/PN.08/2015. Bapak/ibu dewan penguji Bapak Aunurrohm S.Si., DEA ibu Nengah Dwianita Kuswytasari, S.Si., M.Si dan ibu Nur Hidayatul Alami S.Si., M.Si yang telah memberikan masukan, saran dan kritik dalam penyempurnaan tugas akhir ini. Tidak lupa keluarga tercinta, orang terdekat, research team Bioremediasi dan Biofertilizer dan teman – teman angkatan 2011 yang selalu memberikan semangat yang tiada habisnya.

Penulis menyadari masih ada kekurangan, namun besar harapan Tugas Akhir ini dapat bermanfaat.

Surabaya, 8 Juli 2015

Amelia Islamiati

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	iii
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vii
KATA PENGANTAR.....	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Permasalahan	2
1.3 Batasan Permasalahan	2
1.4 Tujuan	3
1.5 Manfaat	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Fosfat	5
2.2 Bakteri Pelarut Fosfat	6
2.3 Mekanisme Pelarutan Fosfat	8
2.4 <i>Azotobacter</i>	10
BAB III METODOLOGI	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	13
3.2 Metode yang Digunakan	13
3.2.1 Purifikasi dan Subkultur Isolat <i>Azotobacter</i>	13
3.2.2 Pembuatan Medium Pikovskaya	13
3.2.3 Uji Kualitatif <i>Azotobacter</i> Sebagai Pelarut Fosfat	14
3.2.4 Uji Kuantitatif Pelarutan Fosfat	15
3.3 Rancangan Penelitian dan Analisis Data	19

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolat <i>Azotobacter</i> sebagai Pelarut Fosfat Secara Kualitatif	21
4.2 Kurva Pertumbuhan Isolat A2, A5, A8	25
4.3 Kurva Standart Fosfat	26
4.4 Konsentrasi Fosfat Terlarut yang Dihasilkan oleh Isolat <i>Azotobacter</i>	28

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan	33
2.5 Saran	33

DAFTAR PUSTAKA	35
----------------------	----

LAMPIRAN	43
----------------	----

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Diameter Zona Bening <i>Azotobacter</i>	23
Tabel 4.2 Diameter Koloni <i>Azotobacter</i>	23
Tabel 4.3 Indeks Kelarutan Fosfat <i>Azotobacter</i>	24

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Bakteri Pelarut Fosfat.....	7
Gambar 3.1 Skematis Kurva Standar PO_4^{3-}	18
Gambar 4.1 Isolat <i>Azotobacter</i> sebagai Pelarut Fosfat yang Membentuk Zona Bening	22
Gambar 4.2 Kurva Pertumbuhan Isolat A2, A5, A8.....	26
Gambar 4.3 Kurva Standart Fosfat.....	27
Gambar 4.4 Kurva Konsentrasi Fosfat Terlarut Isolat <i>Azotobacter</i>	29

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Komposisi Medium	43
Lampiran 2. Skema Kerja Inokulasi Isolat Pada Medium Pikovskaya Padat	44
Lampiran 3. Pengukuran Diameter Koloni dan Diameter Zona Bening	44
Lampiran 4. Skema Kerja Kurva Pertumbuhan <i>Azotobacter</i>	45
Lampiran 5. Skema Kerja Pembuatan Starter <i>Azotobacter</i>	46
Lampiran 6. Skema Kerja Pembuatan Larutan Standar PO_4^{3-} dan Kurva Standar	47
Lampiran 7. Skema Kerja Perlakuan dan Perhitungan Fosfat Terlarut	48
Lampiran 8. Hasil Purifikasi Isolat <i>Azotobacter</i>	49
Lampiran 9. Hasil Subkultur Isolat <i>Azotobacter</i>	50
Lampiran 10. Nilai Absorbansi Kurva Pertumbuhan <i>Azotobacter</i> A2, A5, A8	51
Lampiran 11. Hasil Perhitungan Kepadatan Sel <i>Azotobacter</i> Menggunakan Haemocytometer....	51
Lampiran 12. Nilai Absorbansi Larutan Standar $\text{H}_3(\text{PO}_4)$	52

Lampiran 13. Konsentrasi Fosfat Terlarut	
Isolat <i>Azotobacter</i>	52
Lampiran 14. Analisa Data	53
Lampiran 15. Isolat <i>Azotobacter</i> dalam Medium	
Pikovskaya Cair	54

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Fosfat merupakan salah satu unsur makro esensial dan secara alami fosfat di dalam tanah berbentuk senyawa organik atau anorganik yang tidak larut sehingga ketersediaannya di dalam tanah sangat terbatas (Promod dan Dhevandaren, 1987). Mineral fosfat anorganik pada umumnya terikat sebagai Alumunium Fosfat (AlPO_4) dan Besi (III) Fosfat (FePO_4) pada tanah masam dan sebagai Trikalsium Fosfat ($\text{Ca}_3[\text{PO}_4]_2$) pada tanah basa (Elfiati, 2005). Sebagian besar bentuk fosfat terikat oleh koloid tanah sehingga tidak tersedia bagi tanaman. Tanah dengan kandungan organik rendah memiliki kandungan fosfat organik bervariasi tergantung jenis tanahnya (Ginting *et al.*, 2006). Unsur P termasuk unsur hara makro yang memiliki fungsi penting sebagai penyusun ATP dan DNA (Greenway, 2002 *dalam* Goodbody, 2002).

Aktivitas mikroba tanah berpengaruh langsung terhadap ketersediaan fosfat di dalam tanah. Aktivitas mikroba tanah tersebut dapat membebaskan fosfat terikat menjadi bentuk yang tersedia melalui sekresi asam organik dan mineralisasi fosfat dari bentuk fosfat organik menjadi fosfat anorganik menggunakan enzim fosfatase (Elfiati, 2005). Asam organik sangat berperan dalam pelarutan fosfat karena kaya akan gugus fungsional karboksil ($-\text{COO}$) dan hidroksil ($-\text{OH}$) yang akan membentuk senyawa kompleks dengan ion logam dan mineral yang terikat dengan fosfat, sehingga fosfat terlepas dan tersedia di dalam tanah. Fosfat anorganik terlarut dapat dimanfaatkan oleh tanaman dan mikroorganisme untuk metabolisme dan pembentukan sel-sel baru (Santosa, 2007 *dalam* Saraswati *et al.*, 2007).

Azotobacter merupakan bakteri aerob yang banyak dijumpai di rhizosfer dan mampu menambat N_2 bebas dari atmosfer (Madigan *et al.*, 2012). *Azotobacter chroococcum* mampu menghasilkan asam organik dan dapat melarutkan fosfat (Narula *et al.*, 2002). Genus *Azotobacter* yang diisolasi dari tanah Rizosfer

daerah Singkawang mempunyai kemampuan dalam melarutkan fosfat (Marista *et al.*, 2013)

Beberapa anggota genus *Azotobacter* telah diisolasi dari lahan *Eco Urban Farming* ITS (Khotimah dan Zulaika, 2014). Anggota genus *Azotobacter* tersebut mampu melakukan metabolisme karbohidrat dan menghasilkan asam organik (Zulaika *et al.*, 2014), tetapi isolat *Azotobacter* spp. tersebut belum pernah diteliti apakah mampu melarutkan fosfat.

1.2 Rumusan Permasalahan

Isolat *Azotobacter* yang diisolasi dari lahan *Eco Urban Farming* ITS mampu menghasilkan asam organik diindikasikan dapat melarutkan fosfat. Rumusan permasalahan pada penelitian ini adalah:

1. Apakah semua isolat *Azotobacter* mampu melarutkan fosfat?
2. Apabila isolat *Azotobacter* tersebut mampu melarutkan fosfat, berapakah konsentrasi fosfat yang dapat dilarutkan dalam medium tumbuhnya?

1.3 Batasan Permasalahan

Batasan permasalahan pada penelitian ini adalah:

1. Isolat *Azotobacter* yang digunakan adalah A1a, A1b, A2, A3, A5, A6, A7, A8, A9, A10
2. Sumber fosfat yang digunakan adalah Trikalsium Fosfat ($\text{Ca}_3[\text{PO}_4]_2$)
3. Uji dilakukan dalam skala laboratorium
4. Isolat yang digunakan untuk uji kuantitatif pelarutan fosfat adalah isolat yang mempunyai Indeks Kelarutan Fosfat (IKF) relatif tinggi dibanding isolat yang lain
5. Fosfat yang terlarut diukur menggunakan *Spectrophotometer Spectronic GENEYSS 20®* pada panjang gelombang (λ) 690 nm.

1.4 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah

1. Mendapatkan isolat *Azotobacter* yang mampu melarutkan fosfat
2. Mengetahui konsentrasi fosfat yang dapat dilarutkan isolat *Azotobacter* pada media kulturenya

1.5 Manfaat

Manfaat penelitian ini adalah mendapatkan isolat *Azotobacter* yang unggul dalam melarutkan fosfat sehingga dapat dimanfaatkan sebagai agen biofertilizer.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Fosfat

Fosfat merupakan salah satu unsur makro esensial, Unsur P merupakan unsur yang diperlukan dalam jumlah besar (hara makro). Fosfat di dalam tanah secara alami terdapat dalam bentuk organik dan anorganik. Kedua bentuk tersebut merupakan bentuk fosfat yang tidak larut, sehingga ketersediannya bagi biota tanah sangat terbatas. Mineral fosfat anorganik pada umumnya terikat sebagai AlPO_4 dan FePO_4 pada tanah masam dan sebagai $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (trikalsium fosfat) pada tanah basa. (Elfiati, 2005). Tanaman tidak dapat menyerap P dalam bentuk terikat dan harus diubah menjadi bentuk yang tersedia bagi tanaman. Mikroba tanah berperan dalam beberapa aktivitas dalam tanah seperti pelarutan P terikat oleh sekresi asam dan mineralisasi komponen fosfat organik dengan mengubahnya menjadi bentuk anorganik (Cunningham dan Kuack, 1992).

Unsur Fosfat terdiri dari fosfat anorganik dan fosfat organik (Illmer dan Schinner, 1992). Unsur P organik di dalam tanah berkisar 25% sampai 65% dari total kandungan P di dalam tanah (Brady, 1984). P organik berasal dari sisa tanaman, hewan, dan mikroba. Penguraian senyawa P organik bergantung pada sifat fisikokimia dan biokimia senyawa tersebut, misalnya asam nukleat, fosfolipid, yang mudah diuraikan dan polifosfat, fosfonat yang sulit diuraikan (Mcgrath *et al.*, 1998).

P anorganik di dalam tanah pada umumnya berasal mineral fluor apatit. Dalam proses perubahan iklim dihasilkan berbagai mineral P sekunder seperti hidroksi apatit, karbonat apatit, klor apatit, sesuai dengan lingkungannya. Ion – ion fosfat dengan mudah dapat bereaksi dengan ion Fe^{3+} , Al^{3+} , Mn^{3+} , dan Ca^{3+} . Ataupun terjerap pada permukaan oksida – oksida hidrat besi, aluminium, dan liat (Elfiati, 2005).

Tanaman menyerap fosfat dalam bentuk H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , dan PO_4^{3-} . Ketersediaan fosfat anorganik sangat ditentukan oleh pH tanah, jumlah dan tingkat dekomposisi bahan organik serta kegiatan alam, hanya 0,1% yang dapat digunakan oleh tumbuhan dan mikroba, sisanya dalam bentuk fosfat terikat yang tidak dapat dimanfaatkan (Peix *et al.*, 2011). Hara fosfat diperlukan dalam proses metabolisme tanaman antara lain untuk merangsang pertumbuhan tanaman, perkembangan akar, pertumbuhan buah. Memperkuat batang, meningkatkan ketahanan terhadap hama dan penyakit, pembentukan bunga, dan perkembangan akar (Ginting *et al.*, 2006).

Fosfat merupakan bagian dari protein dan enzim, ATP, RNA, DNA, dan fitin yang berperan dalam proses fotosintesis. Sehingga tanaman harus mendapatkan P yang cukup untuk pertumbuhan dan perkembangannya. Defisiensi fosfat menyebabkan pertumbuhan tanaman menjadi lambat, lemah, dan kerdil (Sumarni *et al.*, 2012).

2.2 Bakteri Pelarut Fosfat

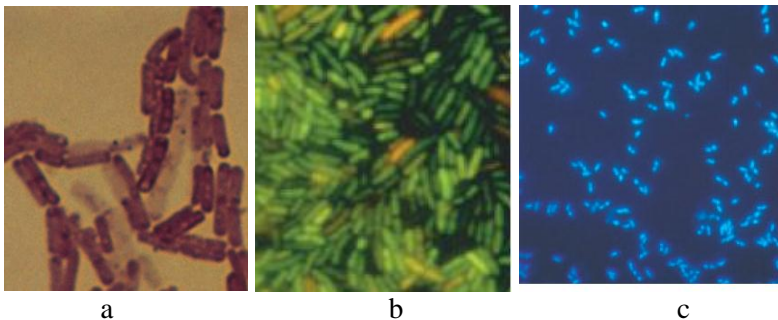
Bakteri pelarut fosfat berpotensi meningkatkan fosfat terlarut bagi tanaman, terutama pada tanah yang mengalami defisiensi fosfat. Aktivitas bakteri tanah berpengaruh langsung terhadap ketersediaan fosfat di dalam larutan tanah. Sebagian aktivitas bakteri tanah dapat melarutkan fosfat dari ikatan fosfat – tak larut (melalui sekresi asam – asam organik) atau mineralisasi fosfat dari bentuk ikatan fosfat – organik menjadi fosfat - anorganik. Selain tanaman fosfat – anorganik juga digunakan oleh mikroba untuk aktivitas dan pembentukan sel – sel baru, sehingga terjadi pengikatan (immobilisasi) fosfat (Santosa, 2007 *dalam* Saraswati *et al.*, 2007)

Bakteri tanah seperti bakteri *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Bacillus* (Gambar 2.1), mempunyai kemampuan melarutkan fosfat anorganik tak larut dengan mensekresikan asam – asam organik (Rao, 1982). Bakteri pelarut fosfat banyak terdapat di rhizosfer

tanaman, ini membuat rizosfer menjadi tempat paling aktif dalam pelarutan fosfat (Kundu *et al.*, 2002).

Daerah rhizosfer adalah daerah perakaran. Bagian akar yang aktif mengeluarkan eksudat adalah bagian akar muda sehingga daerah yang banyak akar – akar muda akan terdapat eksudat yang lebih banyak. Eksudat yang dikeluarkan oleh akar tanaman merupakan salah satu sumber nutrisi bagi mikroorganisme tanah termasuk bakteri pelarut fosfat. Gula yang ada dalam eksudat akar merupakan sumber karbon dan asam amino yang menyumbangkan N bagi pertumbuhan mikroorganisme (Sylvia *et al.*, 1999).

Penggunaan bakteri pelarut fosfat sebagai pupuk hayati mempunyai keunggulan antara lain hemat energi, tidak mencemari lingkungan, mampu membantu meningkatkan kelarutan unsur P yang terjerap, menghalangi terjerapnya P pupuk oleh unsur – unsur penjerap dan mengurangi toksisitas Al^{3+} , Fe^{3+} , dan Mn^{2+} terhadap tanaman pada tanah masam. Pada jenis – jenis tertentu bakteri pelarut fosfat memicu pertumbuhan tanaman karena menghasilkan zat pengatur tumbuh, serta menahan penetrasi pathogen akar karena sifat mikroba yang cepat mengkolonisasi akar dan menghasilkan senyawa antibiotik (Elfiati, 2005).



Gambar 2.1 Bakteri Pelarut Fosfat

Keterangan gambar: (a) *Bacillus* sp (Harley dan Prescott, 2002) (b) *Pseudomonas* sp (Madigan *et al.*, 2012) (c) *Escherichia* (Madigan *et al.*, 2012).

2.3 Mekanisme Pelarutan Fosfat

Di dalam tanah fosfat dapat berbentuk organik dan anorganik yang merupakan sumber fosfat penting bagi tanaman. Fosfat organik berasal dari bahan organik sedangkan fosfat anorganik berasal dari mineral – mineral yang mengandung fosfat. Pelarutan senyawa fosfat oleh mikroorganisme pelarut fosfat berlangsung secara kimia dan biologis baik untuk bentuk fosfat organik maupun anorganik. Mikroorganisme pelarut fosfat membutuhkan adanya fosfat dalam bentuk tersedia dalam tanah untuk pertumbuhannya. Bakteri pelarut fosfat membantu menyediakan hara bagi tanaman dengan melarutkan P- terjerap menjadi bentuk tersedia terutama pada tanah yang dipupuk dengan batuan fosfat (Premono, 1994).

Mekanisme pelarutan fosfat secara kimia merupakan mekanisme pelarutan fosfat utama yang dilakukan oleh mikroorganisme. Mikroorganisme tersebut mensekresikan sejumlah asam organik berbobot molekul rendah seperti oksalat, suksinat, sitrat, laktat, α - ketoglutarat, asetat, format, propionate, glikolat, glutamate, glioksilat, malat, fumarat. Selanjutnya asam – asam organik ini akan bereaksi dengan bahan pengikat fosfat seperti Al^{3+} , Fe^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} membentuk khelat organik yang stabil sehingga mampu membebaskan ion fosfat terikat dan oleh karena itu dapat diserap oleh tanaman. Setiap mikroba pelarut fosfat (MPF) menghasilkan jenis dan jumlah asam organik yang berbeda dan ada kemungkinan satu jenis MPF menghasilkan lebih dari satu jenis asam organik (Adu, 2004).

Pelarutan fosfat dari Al-P atau Fe-P pada tanah masam oleh asam organik yang dihasilkan mikroba pelarut fosfat adalah sebagai berikut:

dimanfaatkan kembali oleh mikroba pelarut fosfat atau mikroba lainnya. Selain mengasimilasi fosfat yang dibebaskannya, mikroba tersebut melepaskan sejumlah besar fosfat terlarut yang merupakan kelebihan dari pasokan nutrisinya ke dalam larutan tanah. Hara fosfat yang larut akan masuk kedalam akar tanaman secara difusi. Kondisi ini akan meningkatkan fosfat tersedia yang dapat diserap akar tanaman. Jika mikroba mati maka P-organik yang terdapat dalam jaringan mikroba akan lepas kembali dalam bentuk P-anorganik (Mearyard, 1999).

2.4 *Azotobacter*

Azotobacter bersifat pleomorfik berkisar antara rod dan coccus, mempunyai diameter 1,5-2,0 μm . tidak membentuk spora namun memiliki struktur kista. Merupakan kelompok bakteri gram negatif, bersifat motil dengan menggunakan flagella petritikus dan beberapa ada yang bersifat tidak motil. Bersifat aerob dan fakultatif anaerob, bersifat kemoorganotrof, dan menggunakan sumber C yang berasal dari gula, alkohol, dan garam. *Azotobacter* merupakan bakteri non-simbiotik yang memfiksasi N_2 bebas dari atmosfer. Ketika memfiksasi nitrogen membutuhkan molybdenum. Bersifat katalase positif dengan range pH 4,8-8,5 dan optimum pada pH 7-7,5. Banyak ditemukan di tanah dan beberapa di air (Holt *et al.*, 1994). *Azotobacter* memiliki ciri koloni yang berair (slimy), berkilau (glistening), berwarna keputih – putihan, elevasi convex (Jimenez *et al.*, 2011)

Azotobacter termasuk dalam kelompok gamma proteobacteria, memiliki struktur *resting cell* yang disebut dengan kista. Kista adalah struktur seperti endospore namun perbedaannya adalah kista tidak tahan terhadap panas. Kista melindungi *Azotobacter* terhadap kondisi lingkungan yang kering, kehancuran sel, dan ultraviolet (Madigan *et al.*, 2012).

Genus *Azotobacter* banyak digunakan sebagai pupuk hayati dalam bidang agrikultur karena memiliki kemampuan mensintesis antibiotik, hormone pertumbuhan tanaman, vitamin dan dapat melarutkan fosfat (Jimenez *et al.*, 2011), *Azotobacter*

mampu menghasilkan hormone pertumbuhan tanaman yaitu IAA (Widiastuti dkk., 2010)

Beberapa spesies *Azotobacter* merupakan salah satu genera bakteri yang berpotensi digunakan sebagai agen bioremediasi pada lingkungan yang tercemar logam berat. *Azotobacter* juga resisten terhadap logam berat seperti Hg, Pb, Cd, dan Cu (Zulaika dkk., 2012).

Azotobacter mampu melakukan metabolisme karbohidrat yang menghasilkan asam organik dan dapat melarutkan fosfat (Narula *et al.*, 2002). *Azotobacter* yang diisolasi di daerah Jute Mill Sungai Gangga mampu melarutkan fosfat sebesar 150,46 µg/ml dari 100 ml medium pikovskaya cair dan memiliki nilai IKF sebesar 2.5 (Paul dan Sinha, 2013). *Azotobacter* yang diisolasi dari tanah pertanian memiliki nilai IKF sebesar 2.08 (Karpagam dan Nagalakshmi, 2014). Spesies *Azotobacter chroococcum* yang diisolasi dari daerah perakaran mampu melarutkan fosfat pada medium cair sebesar 1,793 – 2,081 µg/ml pada suhu 30⁰ C dan melarutkan fosfat sebesar 1,993 – 3,125 µg/ml pada suhu 37⁰ C (Narula *et al.*, 2002).

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB III METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari 2015 sampai dengan April 2015 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

3.2 Metode yang Digunakan

3.2.1 Purifikasi dan Subkultur Isolat *Azotobacter*

Purifikasi isolat *Azotobacter* bertujuan untuk memurnikan kembali isolat *Azotobacter*. Purifikasi menggunakan metode streak 16. Subkultur dilakukan untuk menyimpan stok isolat setelah dipurifikasi. Subkultur menggunakan medium *Nutrient Agar Slant* (NAS). Secara aseptis masing – masing isolat *Azotobacter* diambil sebanyak 1 ose dan diinokulasikan diatas permukaan medium NAS menggunakan metode *streak continue* (Harley dan Prescott, 2002). Tabung reaksi ditutup dengan sumbat dan dibalut dengan plastik *wrap*. Isolat yang telah di subkultur diinkubasi pada suhu kamar dan dilihat pertumbuhannya sampai 24 jam. Keberhasilan subkultur ditandai dengan tumbuhnya isolat disepanjang goresan jarum ose.

3.2.2 Pembuatan medium Pikovskaya

Medium Pikovskaya yang digunakan adalah medium Pikovskaya padat dan Pikovskaya cair. Sumber Fosfat yang digunakan adalah $\text{Ca}_3[\text{PO}_4]_2$. Medium Pikovskaya padat digunakan untuk uji kualitatif pelarutan fosfat dan medium Pikovskaya cair digunakan untuk mengetahui konsentrasi fosfat yang mampu dilarutkan oleh isolat *Azotobacter*.

Semua bahan medium Pikovskaya padat dimasukkan ke dalam erlenmeyer ukuran 250 ml dan dilarutkan dengan 150 ml aquades, selanjutnya dihomogenkan menggunakan *magnetic*

stirrer sampai homogen. Medium Pikovskaya cair komposisi bahan sama seperti medium Pikovskaya padat namun tanpa penambahan agar. Semua bahan Pikovskaya cair dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dilarutkan dengan aquades sampai volume 450 ml. Selanjutnya dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* sampai homogen, kemudian medium dibagi ke dalam 49 tabung reaksi yang masing – masing volumenya diisi sebanyak 9 ml (Rao, 1981). Medium pikovskaya disterilisasi menggunakan *autoklaf* pada tekanan 1,5 atm suhu 121⁰ C selama 20 menit. Medium yang telah disterilkan didinginkan sampai suhu mencapai $\pm 45-50^{\circ}\text{C}$ (Harley dan Prescott, 2002).

3.2.3. Uji kualitatif *Azotobacter* sebagai pelarut fosfat

Uji kualitatif *Azotobacter* sebagai pelarut fosfat untuk mendapatkan isolat yang mampu melarutkan fosfat. Medium Pikovskaya padat dicairkan dan secara aseptis dituang ke dalam cawan petri steril sebanyak 15 ml. Cawan petri digerakkan membentuk angka 8 supaya medium menjadi rata. Medium didiamkan hingga memadat. Masing – masing isolat dari hasil subkultur pada medium NAS diambil sebanyak 1 ose dan diinokulasikan ke dalam medium Pikovskaya dengan metode *spot inoculation* (Cappuccino dan Sherman, 2001). Koloni yang tumbuh dan mampu membentuk zona bening diindikasikan sebagai isolat yang mampu melarutkan fosfat. Pengukuran zona bening dilakukan setiap 48 jam sampai 336 jam (Karpagam dan Nagalakshmi, 2014).

Berdasarkan zona bening yang terbentuk dihitung Indeks Kelarutan Fosfat (IKF) dengan formulasi (Karpagam dan Nagalakshmi, 2014).

$$\text{Indeks Kelarutan Fosfat (IKF)} = \frac{dk + dzb}{dk}$$

Keterangan:

dk = Diameter koloni

dzb = Diameter Zona bening

Pengukuran IKF dilakukan setiap 48 jam sampai 336 jam. Berdasarkan IKF dipilih 3 isolat yang mempunyai nilai IKF tinggi dibandingkan isolat yang lain.

3.2.4 Uji Kuantitatif Pelarutan Fosfat

Kurva Pertumbuhan *Azotobacter*

Kurva pertumbuhan *Azotobacter* digunakan untuk menentukan waktu inokulasi starter *Azotobacter* pada kultur perlakuan pelarutan fosfat. Medium Nutrient Broth (NB) dibuat setengah resep dari resep normal (Khotimah dan Zulaika, 2014). Pengurangan konsentrasi media NB ini dilakukan karena media NB (normal) menunjukkan kurva pertumbuhan *Azotobacter* sampai fase stasioner melebihi 24 jam (Dhanraj *et al.*, 2012).

Satu ose isolat secara aseptis diinokulasikan pada 20 ml medium *Nutrient Broth* (NB). Diinkubasi dengan *rotary shaker* berkecepatan 100 rpm dalam suhu ruang selama 24 jam. Kultur isolat yang telah diinkubasi selama 24 jam ditambahkan ke dalam 180 ml medium NB steril, diinkubasi kembali dengan *rotary shaker* 100 rpm. Pada jam ke-0 dilakukan pengukuran kepadatan sel (*Optical Density*) menggunakan *Spectrofotometer Spectronic Genesys 20®* ($\lambda = 600 \text{ nm}$) (Harley dan Prescott, 2002). Pengukuran OD dilakukan selama 24 jam dengan interval waktu 2 jam.

Berdasarkan kurva pertumbuhan isolat *Azotobacter* pada medium akan didapatkan umur perlakuan untuk uji kelarutan fosfat pada medium Pikovskaya cair. yaitu (μ) jam. Umur perlakuan (μ) jam dihitung dari waktu fase log akhir dikurangi waktu fase log awal dibagi dua.

Pembuatan starter *Azotobacter*

Pembuatan starter bertujuan untuk adaptasi dan memperbanyak sel *Azotobacter* yang akan diinokulasikan ke dalam medium Pikovskaya cair. Secara aseptis masing – masing isolat sebanyak 1 ose diinokulasikan ke dalam 10 ml medium NB. Medium ditutup dengan sumbat penutup dan di wrap. Medium diinkubasi menggunakan *rotary shacker* selama 24 jam. Sebanyak 10 ml medium kultur ditambahkan sebanyak 90 ml NB baru. Diinkubasi menggunakan *rotary shacker* selama μ jam (Cappuccino dan Sherman, 2001). Kepadatan sel dihitung menggunakan *Haemacytometer Improve Nauber* dengan rumus perhitungan (Addis *et al.*, 2001).

$\Sigma \text{ sel/ml} = \frac{N \times \text{Pengenceran}}{1/400 \text{ mm}^2 \times 80 \times 0.1 \text{ mm}} \times \frac{1000 \text{ mm}^2}{1 \text{ ml}}$
--

Keterangan:

N = Jumlah sel yang dihitung pada haemacytometer
 Pengenceran = jika sebelum perhitungan dilakukan pengenceran
 1/400 = luas kotak kecil
 80 = Σ kotak kecil
 1/10 = tinggi haemacytometer
 $\frac{1000 \text{ mm}^2}{1 \text{ ml}}$ = bentuk konversi ke satuan ml

Sebelum dilakukan perlakuan untuk uji kelarutan fosfat. Kepadatan sel yang digunakan adalah 10^6 (Cappuccino dan Sherman, 2001).

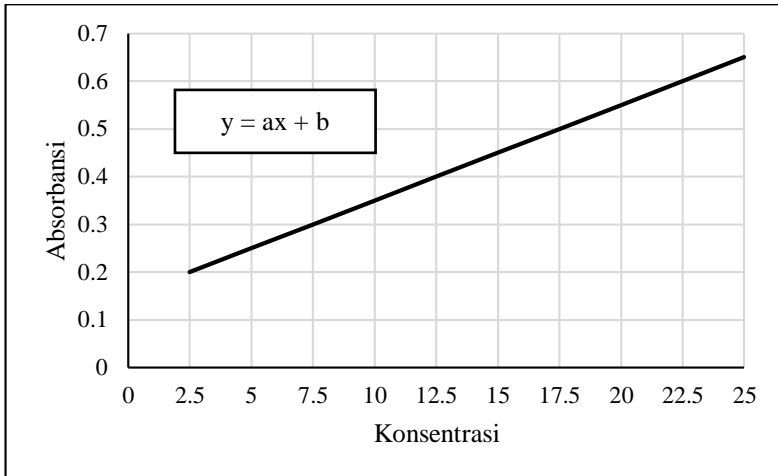
Pereaksi Fosfat Pekat dan Pewarna Fosfat Pekat

Pereaksi Fosfat pekat dibuat dengan melarutkan 1,2 gr ammonium molibdat $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ dalam 50 ml aquades pada labu ukur 100 ml kemudian ditambahkan 0,0277 gr kalium antimonil tartrat $[\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}]$ dihomogenkan selanjutnya ditambah aquades sampai volume menjadi 100 ml dihomogenkan. Pembuatan pereaksi pewarna P pekat adalah

melarutkan 0,106 gr asam askorbat ke dalam 10 ml pereaksi fosfat pekat. Pereaksi pewarna P pekat harus dalam kondisi baru (Santosa, 2007 *dalam* Saraswati dkk., 2007).

Larutan Standar Fosfat dan Kurva Standar

Larutan standar fosfat digunakan untuk membuat kurva standart. Larutan standar fosfat menggunakan larutan stok H_3PO_4 dan dibuat dengan cara ditimbang sebanyak 10 mg H_3PO_4 padat dan dilarutkan dalam 100 ml aquades sehingga didapatkan larutan standar dengan konsentrasi 100 ppm. Larutan standar 100 ppm diencerkan dengan aquades dan dibuat dengan konsentrasi 0; 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5; 20; 22,5; 25 ppm PO_4^{3-} sampai volume masing – masing konsentrasi adalah 5 ml. Masing-masing larutan standar ditambah 0,5 ml pereaksi pewarna P pekat dan dihomogenkan, didiamkan 30 menit. Setiap konsentrasi larutan standar fosfat diukur absorbansinya menggunakan *Spectrofotometer Spectronic Genesys 20®* λ 690 nm (Santosa, 2007 *dalam* Saraswati *et al.*, 2007). Hasil pengukuran absorbansi larutan standar dibuat kurva yang menghubungkan antara nilai absorbansi dengan konsentrasi larutan standar fosfat. Sumbu x menyatakan konsentrasi P dan sumbu y menyatakan Absorbansi, kemudian dibuat persamaan linier $y = ax + b$. Skematis kurva larutan standar fosfat dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Skematis Kurva Standar Fosfat.

Perlakuan pelarutan fosfat

Secara aseptis starter diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi 9 ml medium Pikovskaya cair. Sebagai perlakuan kontrol adalah 9 ml medium Pikovskaya cair tanpa inokulum *Azotobacter*. Medium diinkubasi menggunakan *rotary shaker* dengan kecepatan 100 rpm. Konsentrasi fosfat yang terlarut dalam medium dihitung secara periodik setiap 2 hari selama 14 hari (Santosa, 2007 dalam Saraswati *et al.*, 2007).

Perhitungan fosfat terlarut

Sebanyak 10 ml kultur perlakuan disaring menggunakan kertas saring whatman no 1 kemudian disentrifuse dengan kecepatan 3.000 rpm selama 15 menit. Supernatan hasil sentrifuse dipipet sebanyak 5 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Sebanyak 0,5 ml pereaksi pewarna P pekat ditambahkan ke dalam supernatan, dihomogenkan dan didiamkan selama 30 menit. Absorbansi supernatan dilihat dengan *Spectrofotometer Spectronic Genesys 20®* λ 690 nm. Perlakuan yang sama dilakukan terhadap kontrol (Santosa 2007 dalam Saraswati *et al.*, 2007).

Konsentrasi fosfat terlarut dalam medium dihitung menggunakan persamaan yang telah di dapat dari kurva standar fosfat yaitu:

$$y = ax + b$$

Keterangan:

Y= nilai absorbansi

a = konstanta

b = koefisien

x = nilai konsentrasi fosfat

3.3 Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Penelitian dilakukan secara deskriptif kualitatif untuk mengetahui potensi isolat dalam melarutkan fosfat, sedangkan untuk mengetahui konsentrasi fosfat yang dapat dilarutkan oleh isolat digunakan metode penelitian secara kuantitatif. Analisis regresi digunakan untuk mendapatkan persamaan garis yang akan digunakan sebagai formulasi hitung konsntrasi fosfat terlarut oleh isolat dan analisis korelasi digunakan untuk mengetahui apakah semakin lama waktu inkubasi konsentrasi fosfat terlarut yang dihasilkan semakin tinggi. Analisis korelasi digunakan untuk mengetahui ukuran derajat variasi atau ukuran keeratan hubungan antara kedua variabel tersebut. Uji signifikansi dilakukan menggunakan persamaan berikut:

$$r = \frac{\Sigma(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\Sigma(x - \bar{x})^2 \Sigma(y - \bar{y})^2}}$$

Dimana nilai r terletak antara -1 dan 1 ($-1 \leq r \leq 1$). Angka tersebut menunjukkan adanya korelasi atau hubungan fungsional antara variabel bebas dan variabel terikat. Korelasi linier kecil jika nilai r mendekati 0, sebaliknya korelasi linier negatif jika nilai r mendekati -1 dan korelasi positif jika mendekati 1 (Harinaldi, 2005).

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

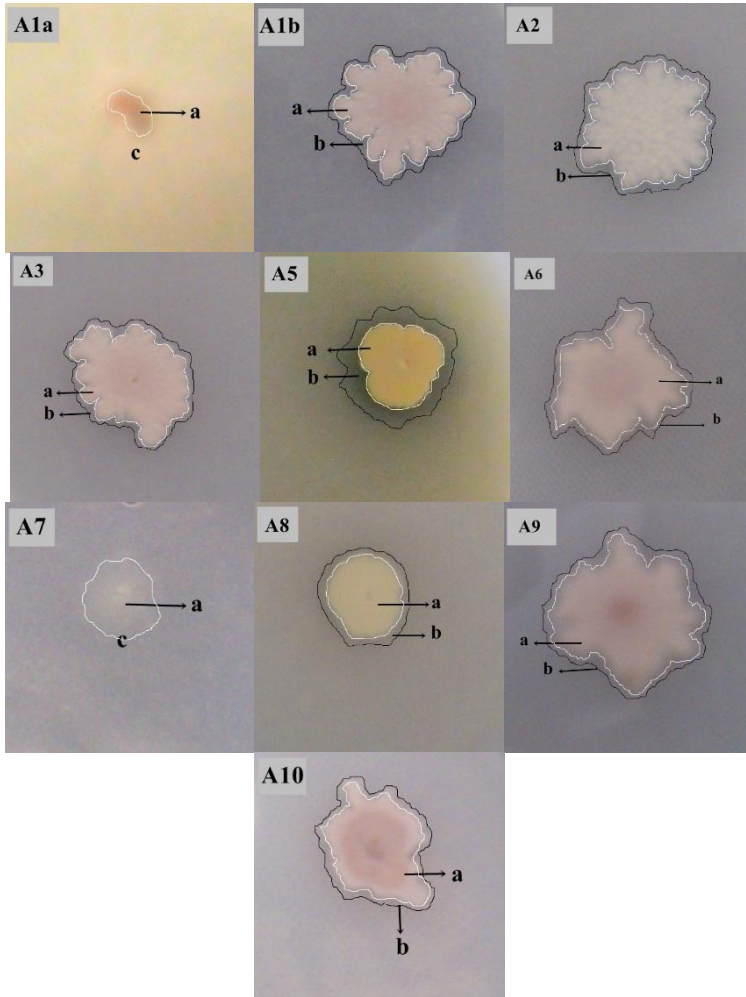
4.1 Isolat *Azotobacter* Sebagai Pelarut Fosfat Secara Kualitatif

Sepuluh isolat *Azotobacter* diuji potensinya sebagai pelarut fosfat. Delapan isolat berpotensi sebagai bakteri pelarut fosfat (BPF). Kemampuan isolat dalam melarutkan fosfat dapat dilihat dari terbentuknya zona bening pada medium Pikovskaya padat (Gambar 4.1). Medium Pikovskaya padat berwarna putih keruh karena mengandung fosfat terikat yaitu $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Saat fosfat tersebut terlepas dalam medium akan ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening (Rahardjo *et al.*, 2007). *Azotobacter* yang mampu membentuk zona bening adalah A1b, A2, A3, A5, A6, A8, A9, A10 sedangkan isolat A1a dan A7 sampai pada akhir masa inkubasi 14 hari tidak membentuk zona bening.

Kemampuan *Azotobacter* membentuk zona bening bervariasi. *Azotobacter* A2, A5, A8 membentuk zona bening pada hari ke - 2, A3 pada hari ke - 4, A1b dan A6 pada hari ke - 6, A9 hari ke-12 dan A10 pada hari ke- 4 (Tabel 4.1). *Azotobacter* mampu membentuk zona bening karena menghasilkan asam organik. Asam organik menyebabkan terjadinya pelarutan fosfat dari sumber fosfat terikat menjadi bentuk yang tersedia (Khiari and Parent, 2005). Asam organik mampu berikatan dengan ion Ca dari $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ dan membebaskan H_2PO_4 sehingga membentuk area yang berwarna jernih (Widawati dan Suliasih, 2005). Asam organik dihasilkan melalui proses metabolisme glukosa dan siklus asam trikarboksilat (TCA) yang merupakan kelanjutan dari reaksi glikolisis (Elfiati, 2005).

Azotobacter yang tidak membentuk zona bening pada medium padat disebabkan isolat tidak mensekresikan asam organik atau sekresi asam organik oleh isolat membutuhkan waktu yang relatif lama, sehingga tidak teramati pada waktu inkubasi sampai dengan 14 hari. Setiap isolat memiliki kecepatan sekresi asam organik yang berbeda (Nautiyal, 1999). Secara genetik isolat akan mensekresikan asam organik dalam jumlah dan jenis yang berbeda.

Jumlah dan jenis asam organik inilah yang berperan dalam menentukan tingginya pelarutan fosfat (Suliasih, 2006).



Gambar 4.1 *Azotobacter* sebagai Pelarut Fosfat yang Membentuk Zona Bening

Keterangan: (a.Koloni; b.zona bening; c.tidak membentuk zona bening)

Tabel 4.1 Diameter Zona Bening *Azotobacter*

Isolat	Dimeter Zona Bening Hari Ke - (cm)						
	2	4	6	8	10	12	14
A2	0.5	1.0	1.1	1.3	1.4	1.5	1.6
A5	0.5	0.6	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
A8	0.4	0.6	0.7	0.8	1.0	1.0	1.2
A3	0.0	0.6	0.9	1.0	1.2	1.2	1.4
A1b	0.0	0.0	0.8	0.9	1.0	1.1	1.1
A6	0.0	0.0	0.9	1.0	1.1	1.2	1.3
A9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4	1.5
A10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4
A1a*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A7*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Keterangan: isolat yang diberi tanda * adalah isolat yang tidak membentuk zona bening

Semua isolat *Azotobacter* mengalami pertambahan diameter koloni seiring bertambahnya waktu inkubasi (Tabel 4.2). Pertambahan diameter koloni menunjukkan pertumbuhan isolat *Azotobacter* karena medium mengandung nutrisi seperti glukosa sebagai sumber C, mikro elemen Mg, Fe, Mn serta garam dan *Yeast Extract* yang mendukung pertumbuhan mikroba (Himedia, 2011).

Tabel 4.2 Diameter Koloni *Azotobacter*

Isolat	Dimeter Koloni Hari Ke - (cm)						
	2	4	6	8	10	12	14
A1a	0.1	0.2	0.2	0.3	0.4	0.4	0.5
A1b	0.3	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	1.0
A2	0.4	0.7	0.9	1.0	1.2	1.3	1.3
A3	0.3	0.5	0.8	0.9	1.0	1.0	1.3
A5	0.3	0.4	0.5	0.5	0.6	0.7	0.7
A6	0.3	0.6	0.8	0.9	1.0	1.1	1.1
A7	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.6
A8	0.3	0.3	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
A9	0.4	0.6	1.0	1.2	1.2	1.3	1.4
A10	0.5	0.9	0.9	1.0	1.1	1.3	1.3

Indeks Kelarutan Fosfat (IKF) isolat *Azotobacter* bervariasi, dari 8 isolat yang menghasilkan zona bening 3 isolat *Azotobacter* memiliki nilai IKF yang relatif lebih tinggi dibandingkan dengan isolat yang lain (Tabel 4.3). *Azotobacter* A5 memiliki nilai IKF sebesar 2,42, A8 sebesar 2,33 dan A2 sebesar 2,23, *Azotobacter* A5 memiliki nilai IKF yang relatif lebih tinggi dari *Azotobacter* A1b, A2, A3, A6, A8, A9, A10, karena *Azotobacter* A5 memiliki hasil perbandingan diameter koloni dan zona bening yang relatif lebih besar dari isolat yang lainnya.

Pada penelitian ini ukuran diameter koloni yang besar tidak selalu menghasilkan nilai IKF yang besar. Misalnya isolat A9 yang memiliki diameter koloni tertinggi namun menghasilkan nilai IKF yang relatif lebih kecil dari isolat A5, A2, dan A8. Diameter koloni isolat yang besar tidak berpengaruh terhadap besar Indeks Kelarutan Fosfat (Saragih, 2013).

Tabel 4.3 Indeks Kelarutan Fosfat *Azotobacter*

Isolat	Indeks Kelarutan Fosfat Hari Ke - (cm)						
	2	4	6	8	10	12	14
A1a	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
A1b	1.00	1.00	2.14	2.12	2.22	2.10	2.10
A2*	2.25	2.42	2.22	2.30	2.16	2.15	2.23
A3	1.00	2.20	2.12	2.11	2.20	2.20	2.07
A5*	2.66	2.50	2.20	2.40	2.33	2.28	2.42
A6	1.00	1.00	2.12	2.11	2.10	2.09	2.18
A7	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
A8*	2.33	3.00	2.40	2.33	2.42	2.25	2.33
A9	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	2.07	2.07
A10	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	2.07

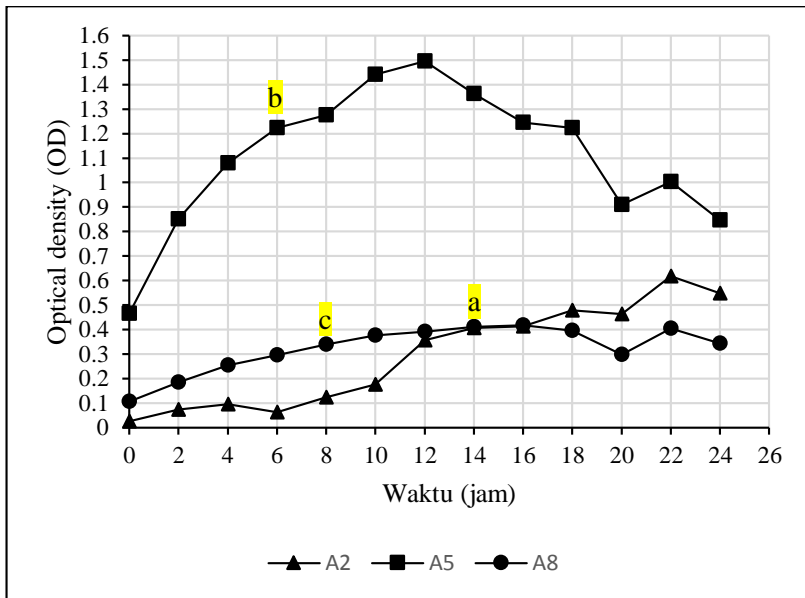
Keterangan: isolat yang diberi tanda * dan ditulis tebal adalah isolat yang memiliki nilai IKF yang relatif lebih tinggi dari isolat yang lain.

Tiga isolat *Azotobacter* (A2, A5, A8) yang memiliki nilai IKF yang relatif tinggi merupakan isolat yang diindikasikan sebagai Bakteri Pelarut Fosfat yang unggul, selanjutnya 3 isolat tersebut akan diuji kemampuannya dalam melarutkan fosfat secara kuantitatif dengan medium Pikovskaya cair.

4.2 Kurva Pertumbuhan Isolat A2, A5, A8

Pola pertumbuhan *Azotobacter* A2, A5 dan A8 tidak menunjukkan fase adaptasi (Gambar 4.2), hal ini disebabkan *Azotobacter* tumbuh pada media yang sama dengan media starter 24 jam sebelumnya sehingga penyesuaian dengan lingkungan yang baru berlangsung cepat. Inokulum yang diinokulasikan pada media baru ketika fase log maka pertumbuhan bakteri akan melanjutkan fase log tanpa melalui fase lag kembali (Khotimah dan Zulaika, 2014). Media dan lingkungan pertumbuhan bakteri yang sama seperti sebelumnya tidak diperlukan waktu adaptasi kembali (Yuliana, 2008).

Berdasarkan kurva pertumbuhan *Azotobacter* A2, A5, dan A8 didapatkan μ jam yang digunakan sebagai dasar untuk menentukan umur perlakuan isolat pada medium Pikovskaya cair. *Azotobacter* A2 dan A8 mempunyai μ 8 jam sedangkan *Azotobacter* A5 μ 6 jam. Pada fase log, biomassa bakteri meningkat seiring dengan bertambahnya waktu inkubasi, jumlah sel mikroba membelah dua kali lipat setiap waktu. Fase log merupakan fase pertumbuhan yang seimbang karena komposisi sel mikroba (protein dan DNA) dalam jumlah tetap (Al Qadri *et al.*, 2007).



Gambar 4.2 Kurva Pertumbuhan Isolat A2, A5 dan A8.

Keterangan gambar: (a. μ jam isolat A2; b. μ jam isolat A5; c. μ jam isolat A8)

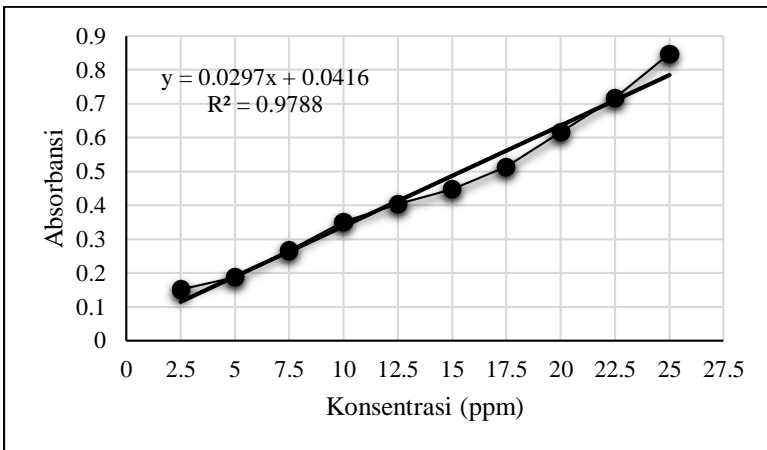
4.3 Kurva Standart Fosfat

Penentuan kurva standar fosfat bertujuan untuk mendapatkan persamaan garis yang digunakan untuk menghitung konsentrasi fosfat terlarut yang dihasilkan oleh isolat *Azotobacter* dalam medium *Pikovskaya* cair. Larutan standar yang digunakan dalam pembuatan kurva standart fosfat menggunakan larutan stok $H_3(PO_4)$ dengan konsentrasi 100 ppm yang diencerkan menjadi 2,5; 5; ... 25 ppm (dengan interval 2,5 ppm).

Pereaksi pewarna fosfat yang digunakan adalah campuran dari ammonium molibdat, kalium antimonil tartrat, dan asam askorbat. Campuran tersebut membentuk larutan berwarna biru. Asorbansi diukur menggunakan spektrofotometer *Spectronic Genesys 20®* dengan panjang gelombang 690 nm. Larutan $H_3(PO_4)$

membentuk kompleks berwarna kuning dengan ion molibdat (kompleks fosfomolibdat). Asam askorbat dan kalium antimonil tartrat akan merubah warna dari kompleks fosfomolibdat menjadi berwarna biru. Terbentuknya warna biru menyebabkan pengukuran serapan cahaya lebih sensitif (Mazaya *et al.*, 2013). Spektrum tampak yang berwarna biru – hijau memiliki serapan cahaya sebesar 620 – 750 nm (Hargis, 1998).

Nilai konsentrasi larutan standart fosfat H_3PO_4) ditetapkan sebagai ordinat dan nilai absorbansi ditetapkan sebagai absis sehingga didapatkan persamaan garis $y = 0.0297x + 0.0416$ dan nilai $R^2 = 0.9788$ (Gambar 4.3).

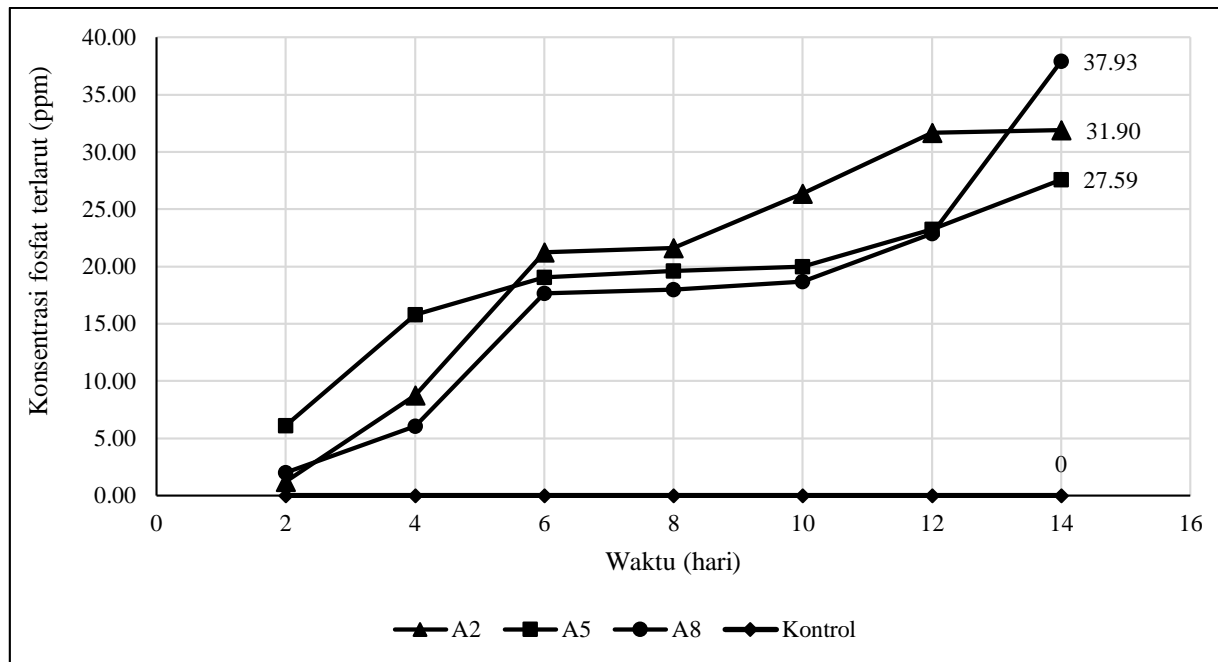


Gambar 4.3 Kurva Standar Fosfat.

4.4 Konsentrasi Fosfat Terlarut yang Dihasilkan oleh Isolat *Azotobacter*

Konsentrasi fosfat terlarut yang dihasilkan oleh *Azotobacter* A2, A5, dan A8 menunjukkan konsentrasi yang semakin tinggi seiring dengan lamanya waktu inkubasi (Gambar 4.4). Pertambahan konsentrasi fosfat terlarut dengan lamanya waktu inkubasi memiliki korelasi positif (*Pearson Correlation* yang mendekati +1, $P\ value < \alpha$, $\alpha = 0.05$) (Egghe and Leydesdorff, 2008). Bertambahnya konsentrasi fosfat terlarut terjadi karena adanya aktivitas pelarutan fosfat oleh isolat melalui sekresi asam organik. Fosfat terlarut dalam medium dimanfaatkan oleh isolat untuk metabolisme sel dan pembentukan energi sehingga isolat mampu tumbuh dan membelah dengan baik sehingga berakibat pada bertambahnya jumlah sel dan produksi asam organik yang menyebabkan konsentrasi fosfat terlarut menjadi semakin tinggi. Fosfat anorganik digunakan oleh mikroba untuk aktivitas dan pembentukan sel – sel baru (Santosa, 2007). Sedangkan kontrol menghasilkan konsentrasi fosfat terlarut yang sama yaitu 0 ppm.

Konsentrasi fosfat terlarut yang paling tinggi dihasilkan *Azotobacter* A8 yaitu sebesar 37,93 ppm. *Azotobacter* A2 menghasilkan konsentrasi fosfat terlarut sebesar 31,90 ppm dan *Azotobacter* A5 menghasilkan konsentrasi fosfat terlarut sebesar 27,59 ppm. *Azotobacter* A5 pada akhir inkubasi menghasilkan fosfat terlarut yang relatif lebih kecil dibandingkan A8 dan A2, hal ini berbeda dengan hasil uji kualitatif menggunakan medium *Pikovskaya* padat yang menunjukkan *Azotobacter* A5 memiliki nilai IKF yang relatif lebih tinggi. Perbedaan tipe medium padat ke medium cair dapat mempengaruhi pertumbuhan dan viabilitas bakteri meskipun medium yang digunakan adalah sama. Pada medium padat, pertumbuhan bakteri melekat pada permukaan medium (*attached growth*) sehingga hanya bagian bawah koloni yang kontak dengan medium, sedangkan pada medium cair tipe pertumbuhannya menyerupai suspensi larut (*suspended growth*) (Li-C, 2007). Bakteri dalam keadaan tersuspensi akan tumbuh merata di semua bagian medium baik di permukaan, di kolom air,



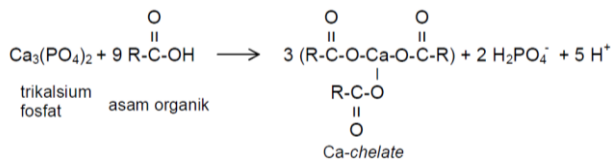
Gambar 4.4 Kurva Konsentrasi Fosfat Terlarut Isolat *Azotobacter*

atau di dasar sehingga setiap sel dapat kontak langsung dengan medium (Hidayah dan Shovitri, 2012). Adanya pemakaian fosfat oleh isolat juga mempengaruhi jumlah konsentrasi fosfat terlarut dalam medium, kemungkinan terjadi pemakaian fosfat yang lebih banyak oleh isolat A5 sehingga isolat A5 menghasilkan fosfat terlarut yang lebih rendah dibandingkan isolat A2 dan A8. Fosfat digunakan untuk aktivitas metabolime seperti pembentukan energi ATP dan biomassa (Rahardjo *et al.*, 2007).

Lama waktu inkubasi juga berpengaruh terhadap perbedaan hasil terbentuknya zona bening pada medium padat dan jumlah konsentrasi fosfat terlarut dalam medium cair. Di dalam medium terdapat glukosa sebagai sumber C yang digunakan untuk metabolisme karbohidrat. Selama glukosa masih tersedia di dalam medium isolat akan menghasilkan asam organik (Abou-zied, 1980), dimungkinkan akan terjadi pertambahan diameter zona bening dan konsentrasi fosfat terlarut yang lebih dari 14 hari. Sehingga bisa terjadi kemungkinan isolat yang memiliki nilai IKF yang tinggi akan menghasilkan fosfat terlarut yang tinggi pula tergantung sekresi asam organik dan penggunaan fosfat oleh isolat. Pada medium padat fosfat terlarut dilihat berdasarkan diameter zona bening yang terbentuk sedangkan pada medium cair fosfat terlarut yang dihasilkan oleh isolat dapat dihitung secara pasti konsentrasinya.

Azotobacter A8 ketika mendekati akhir masa inkubasi mengalami perubahan warna medium yang terlihat signifikan, yaitu dari yang berwarna putih keruh menjadi putih agak kekuningan (Lampiran 15). Perubahan warna yang terjadi diasumsikan karena isolat menghasilkan asam organik yang relatif tinggi sehingga medium menjadi asam dan berubah warna. *Azotobacter* A2, A5, dan A8 mampu melakukan metabolisme karbohidrat glukosa, sukrosa, fructose, maltose, galaktosa, manitol dan sorbitol (Zulaika *et al.*, 2014). Kemampuan bakteri melakukan metabolisme karbohidrat dapat dilihat dari perubahan warna medium dari warna asal menjadi berwarna kuning yang menunjukkan bakteri menghasilkan asam organik (Harley and

Prescott, 2002). Peningkatan asam organik diikuti dengan penurunan pH yang tajam pada medium sehingga berakibat terjadinya pelarutan Ca – fosfat (Alikhani *et al.*, 2006). Selain itu adanya kecenderungan Ca^{2+} membentuk khelat (kompleks yang stabil) dengan asam – asam organik juga menyebabkan terjadinya pembebasan fosfat yang terikat menjadi fosfat larut (Sharma *et al.*, 2011). Reaksi pelarutan fosfat:



Berdasarkan hasil penelitian *Azotobacter* A2, A5, A8 mampu memecah ikatan fosfat tak larut menjadi terlarut melalui sekresi asam organik. Fosfat di dalam tanah umumnya terikat dengan mineral (Ca) dan logam (Fe, Mn, Al). Fosfat merupakan unsur hara makro esensial yang sangat penting untuk pertumbuhan tanaman namun ketersediaannya di dalam tanah terbatas sehingga *Azotobacter* A2, A5, A8 berpotensi sebagai agen biofertilizer yang mampu meningkatkan fosfat tersedia di dalam tanah yang bermanfaat untuk mendukung pertumbuhan tanaman.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian Potensi *Azotobacter* Sebagai Pelarut Fosfat adalah

1. Sepuluh isolat *Azotobacter* hanya 8 isolat yang membentuk zona bening yaitu *Azotobacter* A1b, A2, A3, A5, A6, A8, A9, A10
2. Tiga isolat *Azotobacter* memiliki nilai IKF yang relatif lebih tinggi dari yang lain yaitu *Azotobacter* A2, A5, dan A8
3. *Azotobacter* A2 menghasilkan konsentrasi fosfat terlarut sebesar 31.9 ppm, A5 menghasilkan konsentrasi fosfat terlarut sebesar 27,59 ppm, dan A8 menghasilkan konsentrasi fosfat terlarut sebesar 37,93 ppm.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian enzim fosfatase yang dapat dihasilkan oleh isolat, dimana enzim tersebut diindikasikan berperan dalam proses pelarutan fosfat.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

DAFTAR PUSTAKA

- Abou-zied, M.R. 1980. Production of Microorganism Communicating Current Research and Educational Topics and Trends. **Journal App Microbiol** Vol.7 2: 340-347
- Adds, J., Larkcom, E., Miller, R., dan Sutton, R. 2001. **Tools Techniques and Assessment in Biology**. Cheltenham, U.K. Nelson Thomas Ltd.
- Adu, T.A.S.J. 2004. Efisiensi Pemupukan Fosfat dan Hasil Kacang Tanah (*Arachis hypogaea* L.) Varietas Lokal Kupang Barat Akibat Pemberian Pupuk Fosfat, Kotoran Sapi, dan Bakteri Pelarut Fosfat. **Disertasi**. Bandung: Program Pascasarjana Universitas Padjadjaran.
- Alexander, M. 1977. **Introduction to Soil Mycrobiology 2nd**. New York: John Wiley and Sons.
- Alikhani, H.A., Rastin, N.S., Antoun, H. 2006. Phosphat Solubilization Activity of Rhizobia Native to Iranian Soil. **Plant and Soil** 287: 35 – 41.
- Al Qadri, H.Y.M., Al Alami, N.1., Al Holy, M., Cavinato, A.G., Rasco, B.A. 2007. Studying Of The Bacterial Growth Phases Using Fourier Transform Infrared Spectorcopy and Multivariate Analysis. **Journal of Rapid Method and Automation in Microbiology** 16: 73 - 89.
- Brady, N.C. 1984. **The Nature and Properties of Soils 9th Edition**. New York: Macmillan Publishing Company.
- Cappuccino, J.G., dan Sherman, N. 2001. **Microbiology a Laboratory Manual**. New York: Benjamin Cummings.

Cunningham, J.E., dan Kuiack, C. 1992. Production of Citric and Oxalic Acid and Solubilization of Calcium Phosphat by *Penicillium bilaii*. **Applied and Environmental Microbiology** 58: 145 – 1458.

Dhanraj, S.N., Chonde, S.G., Pallavi, B. 2012. Halophile Nitrogen Fixing Azotobacter Chroococcum N -21 and It Use As a Biofertilizer For Saline Soils. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research** 2(2): 319 – 326.

Egghe, L and Leydesdorff, I. 2008. The Correlation Between Pearson's Correlation Coefficient and Salton's Cosine Measure. **Journal of The American Society for Information Science and Technology**.

Elfiati, D. 2005. Peranan Mikroba Pelarut Fosfat Terhadap Pertumbuhan Tanaman. **e-USU Repository**. Medan: Jurusan Kehutanan Fakultas Pertanian Universitas Sumatra Utara.

Ginting, R.C.B., Saraswati, R., Husen, E. 2006. Dalam Simanungkalit, R.D.M., Suriadikarta, D.A., Saraswati, R., Setyorini, D., dan Hartatik, W. 2006. **Pupuk Organik dan Pupuk Hayati**. Bogor: Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Sumberdaya Lahan Pertanian.

Greenway, A. 2007. A Planetary Environment: A Chemical Prespective. Dalam. Goodbody, I., dan Hope, E.T. 2007. **Natural Resource Management for Sustainable Development in the Caribbean**. Jamaica: Canoe Press University of the West Indies.

Hargis, L.G. 1988. **Analytical Chemistry. Principles and Technigues**. New Jersey : Prentice Hall Inc.

Harinaldi. 2005. **Prinsip – Prinsip Statistik Untuk Teknik dan Sains**. Jakarta: Penerbit Erlangga.

Harley dan Prescott, L.M. 2003. **Microbiology 5th Edition**. New York: Mc Graw Hill.

Hidayah, N., Shovitri, M. 2007. Adaptasi Isolat Bakteri Aerob Penghasil Gas Hidrogen pada Medium Limbah Organik. **Jurnal Sains dan Seni ITS** 1(16).

HiMedia™ Laboratories Pvt Ltd. 2011. **Pikovskaya Broth (Medium)**. <<http://www.himedialabs.com>> [5 September 2014]

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P., Staley, J.T., dan Williams, S.T. 1994. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th Edition**. USA: William and Walkins Pub.

Illmer, P dan Schinner, F. 1992. Solubilization of Inorganic Phosphates by Microorganism Isolated from Forest Soils. **Soil Biol Biochem** 24: 389-395.

Jimenez, D.J., Montana, J.S., dan Martinez, M.M. 2011. Characterization of Free Nitrogen Fixing Bacteria of the Genus Azotobacter in Organic Vegetable Grown Colombian Soils. **Brazilian Journal of Microbiology** 42: 846-858.

Karpagam, T., dan Nagalakshmi, P.K. 2014. Isolation and Characterization of Phosphate Solubilizing Microbes from Agricultural Soil. **Intenational Journal of Current Microbiology and Applied Science** 3(3): 601-614.

Khiari, L., Parent, L.E. 2005. Phosphorous Transformation In Acid t – Textured Soils Treated With Dry Swine Manure. **Canadian Journal of Soil Sciene** 85: 75 – 87.

Khotimah, K., dan Zulaika, E. 2014. Azotobacter Sebagai Bioakumulator Merkuri. **Jurnal Sains POMITS** Vol. 3 No. 2.

Kundu, B.S., Gera, R., Sharma, N., Bhatia, A., dan Sharma, R. 2002. Host Specificity of Phosphat Solubilizing Bacteria. **Ind Journal Nicribiol** 42:19-21.

Li-C, F.H.H.P.2007. Fermentative HydrogenProduction from Waste Water and Solid Wastes by Mixed Culture. **Environ Sci Techn** 37(!): 31 - 39

Madigan, M.T., Martinko, J., Stahl, D.A., dan Clark, D.P. 2012. **Brock Biology of Microorganism Thirteen Edition**. San Fransisco USA: Pearson Education.

Marista, E., Khotimah, S., dan Linda, R. 2013. Bakteri Pelarut Fosfat dari Tiga Jenis Tanah Rizosfer Tanaman Pisang Nipah (*Musa paradisiaca* var. *nipah*) di Kota Singkawang. **Jurnal Protobiont** Vol 2(2): 93-101.

Mazaya, M., Susatyo,E..B., Prasetya, A.T. 2013. Pemanfaatan Tulang Ikan Kakap Untuk Meningkatkan Kadar Fosfor Pupuk Cair Limbah Tempe. **Indonesian Journal of Chemical Science** 2: 1

McGrath, J.W., Hammerschmidt, F., dan Quinn, J.P. 1998. Biodegradation of Phosphomycin by *Rhizobium huakuii* PMY 1. **Applied and Environmental Microbiology** 64:356-58.

Mearyard, B. 1999. Phosphat Enzyme from Plants. **Journal of Biological Education** 33: 109 – 112.

Narula, N., Kukreja, K., Kumar, V., dan Lakshminarayana, K. 2002. Phosphat Solubilization by Soil Isolates of *Azotobacter Chroococcum* and Their Survival at Different Temperatures. **Journal of Agriculture in the Tropics and Subtropics** 103(1): 81-87.

Nautiyal, S.C. 1999. An Efficient Microbiological Growth Medium for Screening Phosphat Solubilizing Microorganism. **FEMS Microbiology Letters** 170:265 – 270.

Paul, D., dan Sinha, S.N. 2013. Phosphat Solubilizing Activity Of Some Bacterial Strains Isolated From Jute Mill Effluent Exposed Water Of River Ganga. **Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences** ISSN 2231-6345 Vol.3 (3) 39 – 45.

Peix, A., Boyero, A.A., Rivas., Mateos, P.F., Barrueco, C., Rodriguez., Molina, E., dan Velaquez, E. 2001. Growth Promotion of Chickpea and Barley by a Phosphat Solubilizing Strain of *Mesorhizobium Medditerraneum* under Growth Chamber Condition. **Soil Biology and Biochemistry** 33: 103 – 110.

Premono, E.M. 1994. Jasad Renik Pelarut Fosfat Pengaruhnya Terhadap P Tanah dan Efisiensi Pemupukan P Tanaman Tebu. **Disertasi**. Bogor: Institut Petanian Bogor.

Promod, K., dan Dhevandaran, K. 1987. Studies on Phosphobacteria in Cochin Backwater. **Journal of the Marine Biological Association of India** 297 – 305.

Rahardjo, B., Supriyadi, A., dan Agustina, D.K. 2007. Pelarutan Fosfat Anorganik oleh Kultur Campur Jamur Pelarut Fosfat Secara in Vitro. **Jurnal Sains dan Matematika** 15:2

Rao, S. 1982. **Biofertilizer in Agriculture**. New Delhi Bombay: Oxford and IBM Publishing Co.

Sakinah, A.L., Zulaika, E. 2014. Resistensi *Azotobacter* Terhadap $HgCl_2$ yang Berpotensi Menghasilkan Enzim Merkuri Reduktase. **Jurnal Sains dan Seni POMITS** Vol 3(2).

Santosa, E. 2007. Mikroba Pelarut Fosfat. Dalam. Saraswati, R., Husen, E., dan Simanungkalit, R.D.M. 2007. **Metode Analisis Biologi Tanah**. Bogor: Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Sumberdaya Lahan Pertanian,

Saragih, A.B. 2013. Skrining Bakteri Pelarut Fosfat Adaptif Vinasse Dari Lahan Tebu Pabrik Gula Jatiroto Kabupaten Lumajang Jawa Timur. **Skripsi**. Jurusan Biologi FMIPA Universitas Jember.

Sharma, S., Kumar, V., Tripathi, R.B. 2011. Isolation of Phosphat Solubilizing Microorganism (PSMs) From Soil. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research** 2: 90 – 95.

Stella, M dan Suhaimi. 2010. Selection of Suitable Growth Medium For Free – Living Diazotroph Isolated from Compost. **Journal Tropical Agricultural and Food Science** Vol 38: 211 - 219

Suliasih, R. 2006. Aktivitas Fosfatase dan Pelarutan Kalsium Fosfat oleh Beberapa Bakteri Pelarut Fosfat. **Jurnal Biodiversitas** 1: 23 -26

Sumarni., Rosliani., Basuki., dan Hilman. 2012. Respon Tanaman Bawang Merah terhadap Pemupukan Fosfat pada Beberapa Tingkat Kesuburan Lahan (Status P- Tanah). **Journal of Horticultural** 22 (2): 130-138,

Sylvia, D.M., Fuhrmann, J.J., Hartel, P.G. and Zuberrerr, D.A. 1999. **Principles and Applications of Soil Microbiology**. New Jersey: Perentice Hall, Inc.

Widawati, S dan Suliasih. 2005. Populasi Bakteri Pelarut Fosfat (BPF) di Cikaniki, Gunung Batol dan Ciptarasa, Serta

Kemampuannya Melarutkan P Terikat di Media Pikovskaya Padat. **Biodiversitas** 7 (1): 10-14.

Widiastuti, H., Siswanto., Suharyanto. 2010. Karakterisasi dan Seleksi Isolat *Azotobacter* sp. untuk Meningkatkan Perkecambahan Benih dan Pertumbuhan Tanaman. **Buletin Plasma Nutfah** Volume 16 (2).

Zulaika, E., Luqman, A., Arindah, T., Sholikhah, U. 2012. Bakteri Resisten Logam Berat Yang Berpotensi Sebagai Biosorben dan Bioakumulator. **Seminar Nasional Waste Management for Sustainable Urban Development. Teknik Lingkungan FTSP ITS**

Zulaika, E., Shovitri, M., Kuswyasari, N.D. 2014. Numerical Taxonomy for Detecting the *Azotobacterial* Diversity. **The 8th Korean – Asean Joint Symposium on Biomass Utilization and Renewable Energy**.

Yuliana, N. 2008. Kinetika Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat Isolat T5 yang Berasal Dari Tempoyak. **Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian** 13: 2

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

Lampiran 1. Komposisi Medium

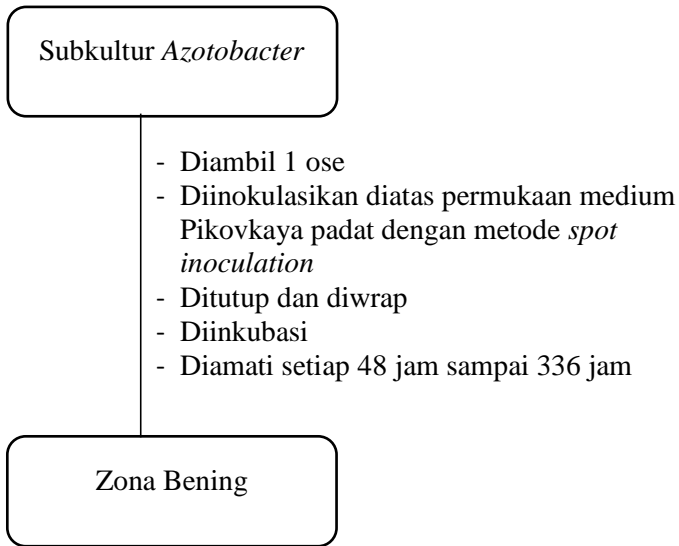
a. Pikovskaya padat

Nama bahan	Gram
Glukosa	0,01
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	0,005
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,0005
MgSO_4	0,001
MnSO_4	0,0001
FeSO_4	0,0001
Ekstrak ragi	0,0005
Agar	0,015
Aquades	150 ml
KCl	0.03
NaCl	0.03

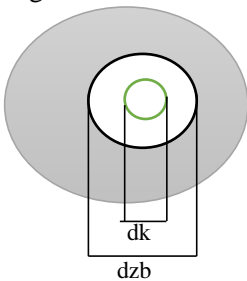
b. Pikovskaya cair

Nama bahan	Gram
Glukosa	4,5
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	2,25
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,225
MgSO_4	0,45
MnSO_4	0,045
FeSO_4	0,045
Ekstrak ragi	0,225
Aquades	450 ml
KCl	0.09
NaCl	0.09

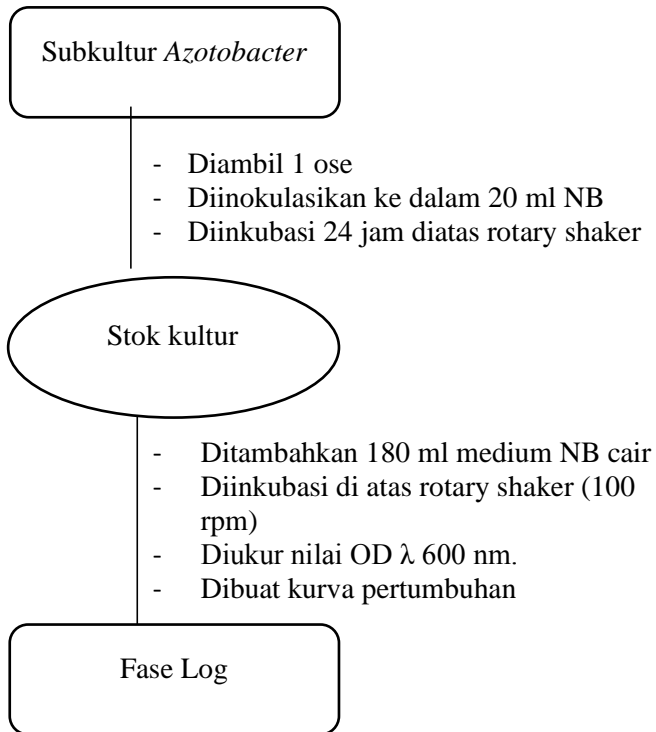
Lampiran 2. Skema Kerja Inokulasi Isolat pada Medium Pikovskaya Padat



Lampiran 3. Pengukuran Diameter Koloni dan Diamter Zona Bening

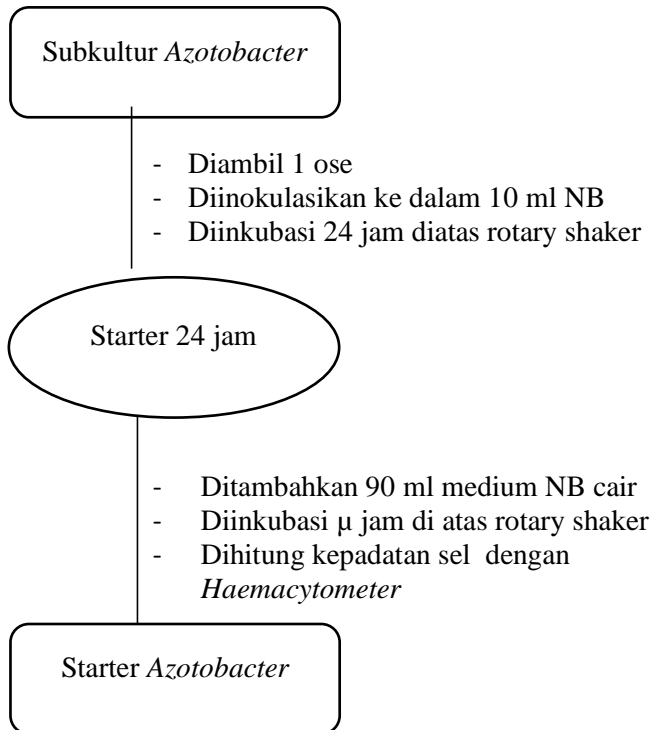


Keterangan:
 dzb: Diameter Zona bening
 dk : Diamter Koloni

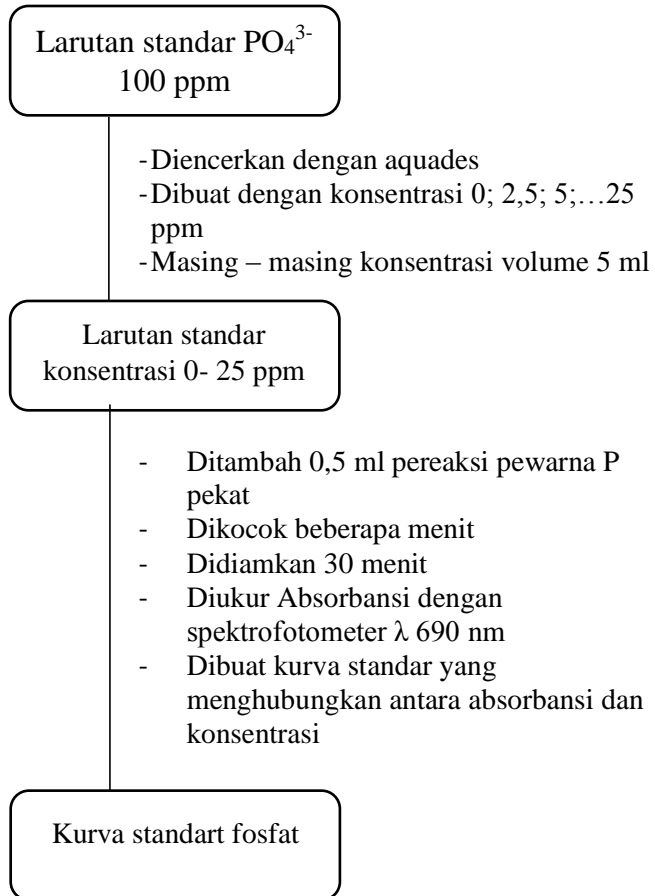
Lampiran 4. Skema Kerja Kurva Pertumbuhan *Azotobacter*

Keterangan:

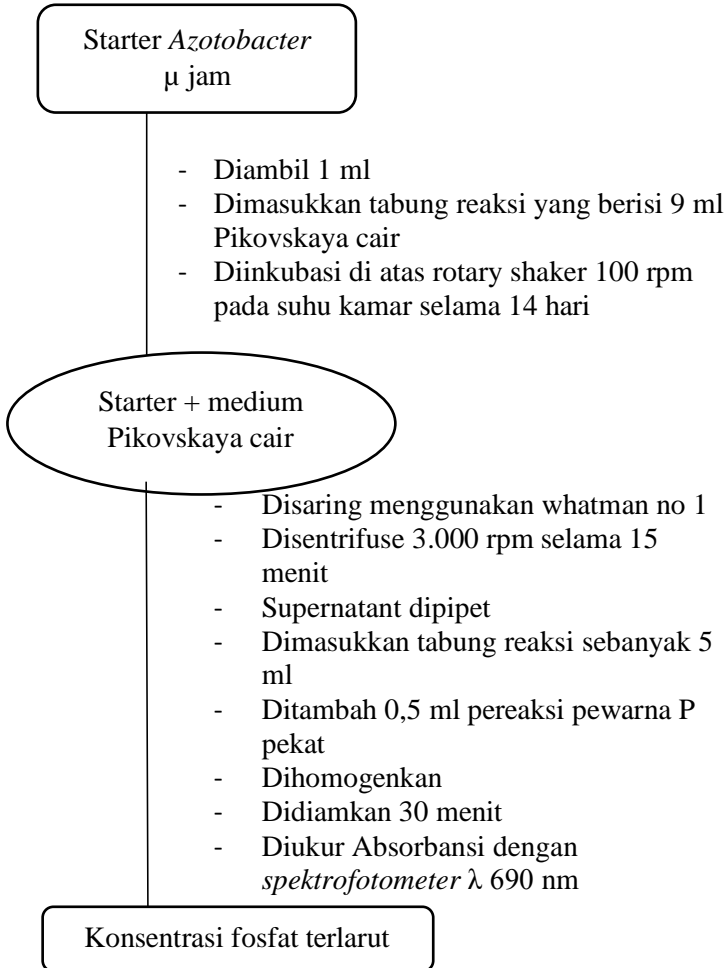
- Setiap 2 jam jam diambil 2 ml dimasukkan kuvet
 - Kurva pertumbuhan
- x = waktu
y = nilai OD

Lampiran 5. Skema Kerja Pembuatan Starter *Azotobacter*

Lampiran 6. Skema Kerja Pembuatan Larutan Standart PO_4^{3-} dan Kurva Standart

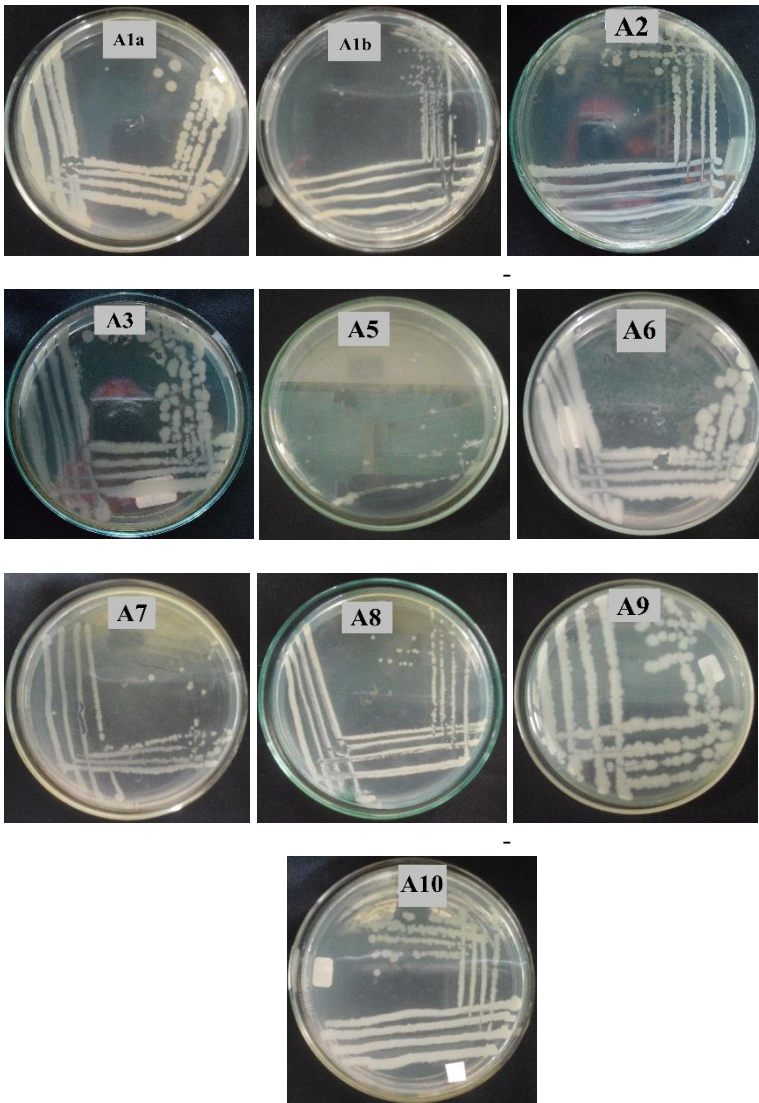


Lampiran 7. Skema Kerja Perlakuan dan Perhitungan Fosfat Terlarut

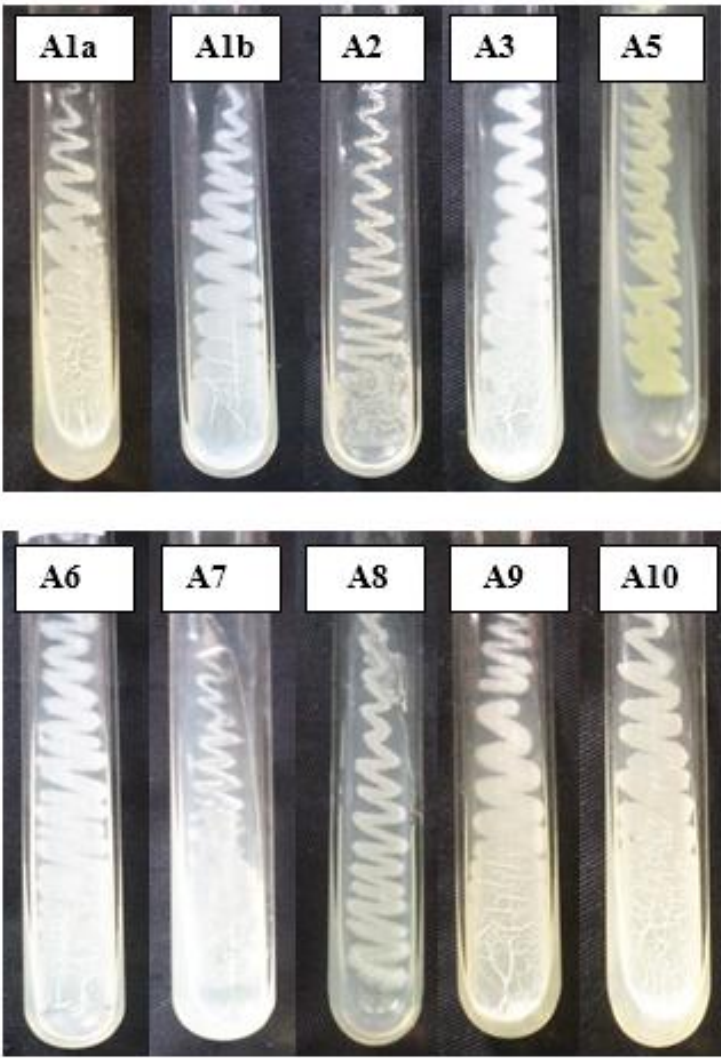


Keterangan:

- Konsentrasi Fosfat terlarut dihitung secara periodik setiap 48 jam

Lampiran 8. Pemurnian Isolat *Azotobacter* Metode Streak 16

Lampiran 9. Hasil Subkultur Isolat *Azotobacter*



Lampiran 10. Nilai Absorbansi Kurva Pertumbuhan *Azotobacter* A2, A5, A8

Tabel Nilai Absorbansi

Jam ke	A2	A5	A8
0	0.026	0.4655	0.106
2	0.074	0.852	0.186
4	0.096	1.08	0.255
6	0.063	1.224	0.297
8	0.125	1.2755	0.339
10	0.176	1.4415	0.377
12	0.357	1.495	0.391
14	0.406	1.363	0.412
16	0.413	1.244	0.418
18	0.479	1.223	0.397
20	0.463	0.909	0.299
22	0.619	1.003	0.405
24	0.549	0.847	0.344

Lampiran 11. Hasil Perhitungan Kepadatan Sel *Azotobacter* Menggunakan Haemocytometer

No	Kode Isolat	Kamar					N	Kepadatan Sel
		1	2	3	4	5		
1	A2	4	8	6	10	8	36	$1,8 \times 10^6$
2	A5	17	31	30	23	39	140	7×10^6
3	A8	36	23	51	55	33	198	$9,9 \times 10^6$

Lampiran 12. Nilai Absorbansi Larutan Standar H₃(PO₄)

Konsentrasi	Absorbansi
2.5	0.151
5	0.188
7.5	0.266
10	0.351
12.5	0.404
15	0.447
17.5	0.514
20	0.616
22.5	0.717
25	0.848

Lampiran 13. Konsentrasi Fosfat Terlarut Isolat *Azotobacter*

Hari	Konsentrasi Fosfat Terlarut (ppm)			
	A2	A5	A8	Kontrol
2	1.23	6.11	2.00	0
4	8.77	15.77	6.07	0
6	21.23	19.07	17.66	0
8	21.63	19.61	17.96	0
10	26.38	19.98	18.70	0
12	31.70	23.25	22.88	0
14	31.90	27.59	37.93	0

Lampiran 14. Analisis Data

A2

Pearson correlation of Hari and
Konsentrasi = 0.955
P-Value = 0.001

A5

Pearson correlation of Hari and
Konsentrasi = 0.925
P-Value = 0.003

A8

Pearson correlation of Hari and
Konsentrasi = 0.941
P-Value = 0.002

Keterangan:

- Hipotesis
H0: Lama hari tidak memberikan pengaruh terhadap
pertambahan konsentrasi
H1: Lama hari memberikan pengaruh terhadap
pertambahan konsentrasi
- Hubungan korelasi tinggi apabila nilai pearson
correlation mendekati +1
- P value < 0.05 (Tolak H0) artinya lama hari memberikan
pengaruh terhadap pertambahan konsentrasi

Lampiran 15. Isolat *Azotobacter* dalam Medium Pikovskaya Cair

a.



b.

Gambar a. Warna medium di awal inkubasi dari kiri ke kanan (A2, A5, A8, kontrol) b. Warna medium isolat A8 setelah 6 hari inkubasi

BIODATA PENULIS



Penulis yang mempunyai nama lengkap Amelia Islamiati dilahirkan di Lamongan pada tanggal 3 Februari 1993, merupakan anak pertama dari dua bersaudara. Pendidikan formal yang telah ditempuh penulis yaitu SDN Made IV Lamongan 1998-2005, SMP Negeri 1 Lamongan tahun 2005-2008, SMA Negeri 2 Lamongan tahun 2008-2011, hingga pada tahun 2011 penulis diterima di Jurusan Biologi ITS melalui program SNMPTN Undangan dan terdaftar dengan NRP 1511 100 027.

Di jurusan Biologi penulis memilih bidang peminatan yaitu bidang mikrobiologi. Pelatihan yang telah ditempuh penulis adalah Pelatihan Karya Tulis Ilmiah (PKTI), LKMM Pra TD, LKMM TD, Organisasi yang pernah diikuti penulis diantaranya adalah Staff Departemen Sosial Masyarakat HIMABITS 2012-2013, Ketua Departemen Sosial Masyarakat Himpunan Mahasiswa Biologi tahun 2013-2014 dan anggota Paguyuban Karya Salemba Empat ITS tahun 2014 - 2015. Alamat email penulis ameliaislamiati@gmail.com, Facebook: Amelia Islamiati, Twitter: @amelislamiati.